

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
27. Dezember 2002 (27.12.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/102417 A1

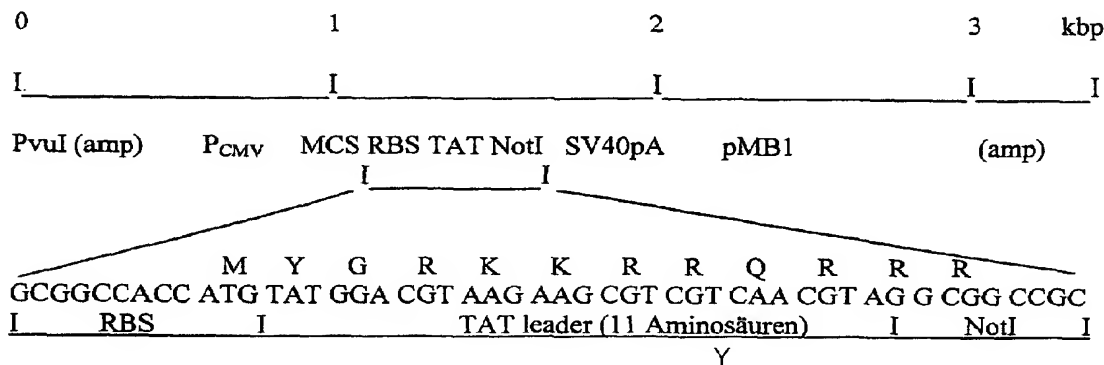
- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 48/00**, C12N 15/62, C07K 14/16 (74) Anwälte: **SCHRELL, Andreas** usw.; Leitzstrasse 45, 70469 Stuttgart (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06234 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
7. Juni 2002 (07.06.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 28 832.8 15. Juni 2001 (15.06.2001) DE (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: **REISS, Jochen** [DE/DE]; Friedländer Strasse 17A, 37133 Klein Schneen (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: VECTOR AND THE USE THEREOF IN GENE THERAPY METHODS

(54) Bezeichnung: VEKTOR UND DESSEN VERWENDUNG IN GENTHERAPEUTISCHEN VERFAHREN

X **pCURE: Skizze des mit PvuI linearisierten Plasmids (3.4 kbp)**



X ... pCURE: DIAGRAM OF PLASMID LINEARIZED BY PvuI (3.4 kbp)
Y ... AMINO ACIDS

(57) Abstract: The invention relates to a vector, which is particularly suitable for somatic gene therapy, to pharmaceutical compositions containing the vector and to the use of said vector. The inventive vector contains at least one nucleotide sequence that codes for a translocation sequence, selected from the group composed of nucleotide sequences that code for the protein HSV VP22, an HIV-Tat translocation domain and the antennapedia peptide.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft einen insbesondere für die somatische Gentherapie geeigneten Vektor, pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend diesen Vektor sowie Verwendungen des Vektors. Der erfindungsgemäße Vektor beinhaltet mindestens eine für eine Translokationssequenz codierende Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nukleotidsequenzen codierend für das HSV VP22-Protein, einer HIV-TAT Translokationsdomäne und dem Antennapedia-Peptid.



WO 02/102417 A1



OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Vektor und dessen Verwendung in gentherapeutischen Verfahren

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Vektor,
5 insbesondere einen Plasmidvektor für gentherapeutische Zwecke, insbesondere für die somatische Gentherapie, pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend diesen Plasmidvektor sowie Verwendungen und Verfahren unter Einsatz dieses Plasmidvektors.

10 Gentherapeutische Verfahren sind Verfahren zur Korrektur von erblich bedingten Erkrankungen unter Einsatz gentechnologischer Methodik durch Ersetzen eines oder mehrerer defekter Gene, durch zusätzliches Einbringen des normalen Gens oder durch Einbringen eines Gens, das die Wirkung des defekten

15 Gens kompensiert. Gentherapeutische Verfahrensweisen befinden sich gegenwärtig noch im Experimentalstadium am Tier. Es wird zwischen der Keimbahn-Gentherapie und der somatischen Gentherapie unterschieden. Im Zuge der Keimbahn-Gentherapie wird der

20 genetische Defekt im frühen Embryonalstadium behoben, so dass auch die Keimzellen des Individuums betroffen werden und die veränderte genetische Information an die Nachkommen weitergegeben wird. Die

25 somatische Gentherapie behebt genetische Defekte dagegen allein in den Körperzellen entwickelter Organismen zum Beispiel durch Übertragen eines Normalfunktion aufweisenden Gens. Das an die Nachkommen weitergegebene Erbgut enthält daher nach wie

30 vor den genetischen Defekt. Üblicherweise werden im Rahmen der somatischen Gentherapie zunächst zu behandelnde Körperzellen dem Körper entnommen, an-

schließlich die gewünschten genetischen Veränderungen in den Zellen in vitro durchgeführt, und zwar in der Regel durch Transformation der Zielzellen mit dem gentherapeutisch eingesetzten Gen transformierte Zellen selektioniert und anschließend in den Patienten reimplantiert.

Voraussetzung für jede erfolgreiche Gentherapie ist die Kenntnis der molekularen Ursachen des zu behandelnden Defektes. Voraussetzung ist auch die Bereitstellung einer möglichst hohen Anzahl mit dem erwünschten Gen transformierter Zellen. Die Transformation, das heißt das Einschleusen genetischen Materials in die Zellen geschieht üblicherweise mittels chemisch-physikalischer Methoden, zum Beispiel Mikroinjektion von DNA, oder durch Verwendung von Vektoren, zum Beispiel Retroviren, Adenoviren, Herpes simplex-Viren, DNA-aufweisenden Liposomen oder Plasmidvektoren.

So sind zum Beispiel aus der WO 99/66061, der WO 99/04026, der WO 96/37623 oder der WO 96/14332 virale Vektoren bekannt, die für den Einsatz in gentherapeutischen Verfahren vorgeschlagen werden und in der Lage sind, genetisches Material in Zielzellen einzuführen.

Aus der WO 99/59546 sind polymere Genträger bekannt, die Nucleinsäuren in Zellen einführen können. Die WO 98/40502 beschreibt Peptid- oder Protein-haltige Zusammensetzungen, die neben einem Transfektionsagens auch Nucleinsäuren enthalten und für gentherapeutische Verfahren verwendet werden können.

Die US 5,804,604 und US 5,674,980 beschreiben die Verwendung eines Plasmides für therapeutische Zwecke. Dieses Plasmid codiert ein Fusionsprotein, umfassend einen basischen Bereich des HIV-TAT-Transportproteins (HIV : humaner Immundefizienzvirus) und den Papillomavirus E2-Repressor. Das aus dem TAT-Transportproteinteil und dem E2-Repressorprotein gebildete Fusionsprotein dient gleichsam als Transportvehikel für das Einschleusen interessierender Peptide, Makromoleküle oder kleinerer Moleküle wie Nucleinsäuren oder Polysaccharide in Zielzellen.

Die WO 87/02989 beschreibt das HIV TAT-3 Protein sowie Plasmide, die dieses Protein codierende Nucleinsäuresequenzen aufweisen. Es wird offenbart, dass das rekombinante TAT-3 Protein für die Diagnose und Therapie von HIV-Infektionen dienen kann.

Schließlich offenbart Schwarze et al. (Science (1999) 285, 1569-1572) die intraperitoneale Injektion eines das HIV-TAT-Protein umfassenden Fusionsproteins in Mauszellen.

Die beschriebenen im Rahmen der Gentherapie eingesetzten Transformationsverfahren weisen den Nachteil vergleichsweise geringer Effizienz auf. Die für einen gentherapeutisch erfolgversprechenden Ansatz notwendige Zahl transformierter Zellen lässt sich kaum oder gar nicht erreichen. Die beschriebenen Verfahren weisen zudem häufig auch den Nachteil auf, dass die Expressionsrate in den transformierten Zellen nicht hoch genug ist, um einen therapeutischen Effekt erwarten zu lassen.

Als besonders nachteilig erweist sich, dass manche Gewebe oder Organe wie das Gehirn für Stoffwechselprodukte nur schwer zu erreichen und aufgrund der Blut/Hirn-Schranke auch nicht von anderen
5 Organen mit Proteinen versorgt werden können. Gerade in solchen Geweben oder Organen ist eine somatische Gentherapie besonders problematisch.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher das technische Problem zugrunde, Mittel und Verfahren bereitzustellen, die die für ein erfolgreiches gentherapeutisches Verfahren notwendige hohe Transformations- und Expressionsrate interessierender Gene gewährleisten.
10

Die vorliegende Erfindung löst das ihr zu Grunde liegende technische Problem durch die Bereitstellung eines Vektors für gentherapeutische Zwecke, umfassend mindestens eine Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus einer Nucleotidsequenz codierend für das HSV VP22-Protein (HSV-VP22: Elliott und O'Hare Cell (1997) 88, 223-233), einer Nucleotidsequenz codierend die HIV-TAT-Proteintransduktionsdomäne und einer Nucleotidsequenz codierend das Antennipedia-Peptid (Antennipedia: Derozzi et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 10444-10450, Helix der Homeodomäne: RQIKIWFGNRRMKWKK), SEQ ID Nr. 4).
15
20
25

Insbesondere ist ein derartiger Vektor als Plasmidvektor, viraler Vektor oder Liposom ausgeführt.

Die vorliegende Erfindung löst das ihr zu Grunde liegende technische Problem insbesondere durch ei-
30

nen Plasmidvektor, umfassend operativ miteinander verknüpft in 5'- zu 3'-Richtung mindestens einen konstitutiv exprimierenden Promotor, die mindestens eine Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz, eine NotI-Clonierungsstelle für die Insertion mindestens einer gentherapeutisch sinnvollen Nucleotidsequenz und eine Polyadenylierungsstelle. Erfindungsgemäß bevorzugt wird ein Plasmidvektor für gentherapeutische Zwecke bereitgestellt, wobei die Translokationssequenz die 11 Aminosäuren YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nr. 2) des natürlich vorkommenden HIV-TAT-Leitpeptids umfasst. In einer Variante umfasst die Translokationssequenz die 11 Aminosäuren YARAAARQARA (SEQ ID Nr. 5) eines durch gezielte Aminosäureaustausche modifizierten HIV-TAT-Leitpeptids.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird ein Plasmidvektor für gentherapeutische Zwecke bereitgestellt, der als pCURE bezeichnet wird (Figur 1), umfassend in operativer Verknüpfung und in 5'- zu 3'-Orientierung mindestens einen konstitutiv exprimierenden Promotor, mindestens eine Ribosomenbindestelle (RBS) codierende Nucleotidsequenz, mindestens eine die HIV-TAT-Leitpeptid codierende Nucleotidsequenz, insbesondere codierend die 11 Aminosäuren YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nr. 2), eine NotI-Clonierungsstelle für die Insertion einer gentherapeutisch sinnvollen Nucleotidsequenz, insbesondere eines gentherapeutisch sinnvollen Genes, und eine Polyadenylierungsstelle.

Die erfindungsgemäßen Plasmidvektoren zeichnen sich durch eine Translokationssequenz, insbesondere

eine HIV-TAT-Leitpeptidsequenz codierende Nucleotidsequenz aus, die unmittelbar und übergangslos im Leseraster an einer zum Beispiel ein therapeutisch sinnvolles Protein oder Proteinfragment codierenden Nucleotidsequenz angeknüpft ist, so dass im Verlauf der Transkription und Translation insbesondere ein die HIV-TAT Leitpeptidsequenz oder eine modifizierte HIV-TAT-Leitpeptidsequenz aufweisendes Fusionsprotein in der Zielzelle, das heißt der zu transformierenden beziehungsweise transformierten Zelle gebildet wird. Der erfindungsgemäß bevorzugt vorgesehene Einsatz einer Translokations-Leader-Sequenz (Leitpeptidsequenz oder Translokationssignal) von 11 Aminosäuren, also der Proteintransduktionsdomäne des HIV-TAT-Proteins, ermöglicht dem in einer Zielzelle gebildeten Fusionsprotein überraschenderweise den Export aus der transformierten Zelle und den Import in mindestens eine weitere Zelle, insbesondere auch das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke. Es zeigte sich überraschend, dass die Translokationseigenschaft einer modifizierten HIV-TAT-Proteintransduktionsdomäne, insbesondere mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 5, als Leitpeptid gegenüber der natürlich vorkommenden Proteintransduktionsdomäne des HIV-TAT-Proteins sogar noch weiter verbessert ist.

Das vom erfindungsgemäßen Vektor codierte Fusionsprotein eignet sich also zum interzellulären Transport. Der Einsatz des erfindungsgemäßen Plasmidvektors führt erfindungsgemäß auch zu einer erhöhten Anzahl von transformierten Zellen mit intaktem Protein je mit DNA transformierter Zelle.

Der erfindungsgemäße Plasmidvektor trägt darüber hinaus bevorzugt eine mit der Leitsequenz verknüpfte Translations-Initiationssequenz, nämlich eine die RBS-Sequenz (Ribosomenbindestelle, "Kozak-Sequenz")
5 codierende Nucleotidsequenz und insbesondere alle weiteren für die Transkription erforderlichen Elemente, wie einen konstitutiv exprimierenden Promotor, zum Beispiel der CMV-Promotor oder der humane beta-Aktin-Promotor für die ubiquitäre Expression,
10 eine Polyadenylierungsstelle, vorzugsweise die Polyadenylierungsstelle von SV40 (=SV40pA) sowie mindestens ein Terminationssignal.

Der erfindungsgemäße Plasmidvektor ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform, gemäß welcher
15 der Vektor ohne inserierte Fremd-DNA eine Größe von lediglich 2,8 kbp (Figur 2) bis 3,4 kbp (Figur 1) aufweist, extrem klein und kann daher auch große und/oder mehrere gentherapeutisch sinnvolle Gene oder Genabschnitte aufnehmen. Die Insertion der
20 gentherapeutisch sinnvollen Gene oder Genabschnitte erfolgt durch die erfindungsgemäß bevorzugte vorteilhafterweise nur einmal im Vektor vorkommende, das heißt „unique“ NotI-Schnittstelle, die unmittelbar hinter der das Leitpeptid codierenden Nucleotidsequenz liegt beziehungsweise mit dieser überlappt.
25

Erfindungsgemäß ist in einer bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, dass das Plasmid mit entwicklungs- oder gewebespezifischen oder regulierbaren regulatorischen Elementen, zum Beispiel Promotoren oder Enhancern versehen wird, die mittels ei-
30

ner multiplen Clonierungsstelle in den Vektor eingefügt werden.

Erfindungsgemäß ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform vorgesehen, eine multiple Clonierungsstelle für die Insertion mindestens eines regulatorischen Elementes im erfindungsgemäßen Plasmidvektor vorzusehen, insbesondere diese - in 5'- zu 3'-Richtung - zwischen einem konstitutiv exprimierenden Promotor und einer Ribosomenbindungsstelle einzufügen. In einer bevorzugten Variante ist der konstitutiv exprimierende der CMV-Promotor.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Plasmidvektors umfasst die Translokationssequenz eine modifizierte Aminosäuresequenz, die aus der Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 2 durch Addition, Deletion oder Austausch von mindestens einer Aminosäure, bevorzugt von 6 Aminosäuren hervorgeht. Insbesondere werden dabei die Aminosäuren Glycin, Lysin und/oder Arginin durch die Aminosäure Alanin ersetzt.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Plasmidvektor, worin die Translokationssequenz eine modifizierte Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Aminosäuresequenz SEQ ID Nr. 5 durch Addition, Deletion oder Austausch von mindestens einer Aminosäure, bevorzugt von einer bis fünf Aminosäuren hervorgeht.

Erfindungsgemäß bevorzugt besitzt der Plasmidvektor eine als „N-linker“ fungierende Nucleotidsequenz, worin die eine Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz enthalten ist. In einer Variante

dieser bevorzugten Ausführungsform umfasst die als „N-linker“ fungierende Nucleotidsequenz die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 12. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform enthält der erfindungsgemäße Plasmidvektor eine als „C-linker“ fungierende Nucleotidsequenz, worin die die Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz enthalten ist. In einer bevorzugten Variante dieser Ausführungsform umfasst die als „C-linker“ fungierende Nucleotidsequenz die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 13. Bevorzugt wird die Translokationssequenz stets mit dem N-Terminus einer gentherapeutisch sinnvollen Nucleotidsequenz fusioniert. Es ist jedoch denkbar, dass bei bestimmten gentherapeutisch sinnvollen Nucleotidsequenzen wie Enzyme der native N-Terminus erhalten bleiben muss, da er entweder nur in dieser nicht-fusionierten Konformation an der enzymatischen Aktivität beteiligt ist oder weil er seinerseits spezifische Transportsignale trägt, zum Beispiel für den Import in den Zellkern oder in die Mitochondrien oder für den Export in die extrazelluläre Matrix, wobei zusätzlich eine Abspaltung der Leitpeptidsequenzen nach Durchtritt durch die entsprechende Membran möglich oder sogar nötig ist. Andererseits besitzen einige gentherapeutisch sinnvolle Nucleotidsequenzen wie Enzyme einen funktionellen C-Terminus, der zur Aufrechterhaltung der katalytischen Eigenschaften nicht blockiert werden darf. Um diesen beiden Möglichkeiten Rechnung zu tragen, wurden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen N-linker und C-linker als wahlweiser Bestandteil des erfindungsgemäßen Plasmidvektors konstruiert. Für die Codierung von Proteinen mit entweder N- oder C-terminaler Proteintransduktionsdomäne zur Einclonierung

domäne zur Einclonierung entsprechender gentherapeutisch sinnvoller Nucleotidsequenzen in die Not I-Schnittstelle des erfindungsgemäßen Plasmidvektors. Erfindungsgemäß bevorzugt werden daher zwei
5 Versionen von Therapieplasmiden bereitgestellt. Zum einen pCURE2C, zum anderen pCURE2N (Figur 2).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff "gentherapeutischer Zweck" verstanden, dass der erfindungsgemäße Vektor, insbesondere Plasmidvektor, für jegliche gentherapeutische Zwecke eingesetzt werden kann, insbesondere
10 für das Einführen von körperfremden oder körpereigenen Nucleinsäuresequenzen, insbesondere DNA-Sequenzen, in Zielzellen. Erfindungsgemäß können
15 als Zielzellen beliebige Zellen des menschlichen oder tierischen Körpers, zum Beispiel eines Säugtierkörpers verstanden werden. Es kann sich dabei um Embryonal-, Stamm-, Körper- oder Keimbahnzellen jeglichen Entwicklungsstadiums handeln. Die Erfindung betrifft also auch die Verwendung des Vektors,
20 insbesondere Plasmidvektors, sowohl für die Soma-zell-Gentherapie als auch für die Keimbahn-Gentherapie. Die Erfindung erfasst jedoch auch die Verwendung des Vektors, insbesondere Plasmidvektors,
25 für andere als gentherapeutische Zwecke, zum Beispiel für Forschungszwecke oder für gendiagnostische Zwecke.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff "operativ miteinander verknüpft"
30 verstanden, dass die miteinander verknüpften Elemente so miteinander verknüpft sind, dass sie bestimmungsgemäß zusammenwirken können, zum Beispiel

dass operativ miteinander verknüpfte Transkriptionselemente eine korrekte Transkription gewährleisten. Operativ miteinander verknüpfte Transkriptions- und Translationselemente ermöglichen eine korrekte Expression, das heißt insbesondere Transkription und Translation, zu einem funktionsfähigen Translationsprodukt.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „gentherapeutisch sinnvollen“ Nucleotidsequenzen, zum Beispiel auch Gene, Genabschnitte oder andere strukturelle Genombereiche verstanden, deren Einfügen in eine Zielzelle aus therapeutischer Sicht sinnvoll ist. Die zu inserierenden Nucleotidsequenzen, insbesondere Gene, können endogen oder exogen zu der Zielzelle sein. Es kann sich dabei um Nucleotidsequenzen handeln, die zur Komplementation oder Korrektur von Gendefekten im behandelten Körper dienen. Es können darunter jedoch auch ein oder mehrere Genabschnitte verstanden werden, die dem Ausschalten von Zielgenen in Zielzellen dienen, beispielsweise mittels homologer Rekombination. Gentherapeutisch sinnvolle Nucleotidsequenzen, insbesondere Gene oder Genabschnitte, können auch Antisinn-Konstrukte sein, die der Transkriptionsinhibition in der Zielzelle dienen und damit die Expression bestimmter Proteine verhindern oder reduzieren.

Für die Insertion in den vorliegenden Plasmidvektor geeignete Gene oder Genabschnitte können natürlich auch Protein-codierende oder nicht-Protein codierende Bereiche sein. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter gentherapeutisch

sinnvollen Proteinen Genprodukte verstanden, die in natürlicher Form, das heißt Wildtypform, oder modifizierter Form in Zielzellen nach Einfügen mittels gentechnologischer Methoden exprimiert werden.

5 Derartige gentherapeutisch sinnvolle Proteine können beliebige Proteine sein, die zum Beispiel in defekter Form in der Zelle vorkommen oder dort gar nicht exprimiert werden und mittels der Gentherapie in die Zelle eingebracht werden können, es können
10 aber auch Proteine sein, die in der Zielzelle auch natürlicherweise nicht vorkommen, gleichwohl aber therapeutisch dort erwünscht sind. Derartige Proteine können auch als Proteinfragmente oder Fusionsproteine ausgeführt sein und gegebenenfalls Modifikationen, zum Beispiel posttranslationelle Modifikationen, aufweisen. Von besonderem Interesse sind
15 Gene, die in der Zielzelle abwesende, in verringerter Menge oder in mutanter Form vorhandene Proteine codieren. Derartige Proteine können insbesondere Hormone, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Lymphokine, Cyto-
20 kine, Rezeptoren und ähnliches ein. Insbesondere kann es sich um Faktor VIII, tPA oder den Molybdän-Cofaktor handeln.

Die Molybdän-Cofaktor-Defizienz ist eine schwere
25 neurologische bisher nicht therapierbare und schließlich letale Erkrankung. Hier reichen kleinste Mengen an intaktem Cofaktor und somit auch an Biosynthese-Enzymen für einen klinisch unauffälligen Phänotyp aus. Hauptsyntheseort ist die Leber,
30 die relativ gut erreichbar ist. Die hier gebildeten Enzyme können aufgrund der erfindungsgemäßen Vorgehensweise unter Verwendung des erfindungsgemäß ein-

gesetzten Translokationssignales exportiert und auch vom Gehirn aufgenommen werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Behandlung der Molybdän-Cofaktor-Defizienz und Molybdän-Cofaktor-Mangelkrankheiten, wie der Sulfitoxidasemangel oder der Xantinoxidasemangel.

Weitere Beispiele für zu inserierende Gene sind Gene die für Hämoglobin, Interleukin-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, menschlichen Wachstumsfaktor, Insulin, Faktor IX, LDL-Rezeptoren, Tumornecrosefaktor, PDGF, EGF, NGF, IL-1ra, EPO, TPO, Beta-Globin sowie biologisch aktive Muteine dieser Proteine codieren.

Da der erfindungsgemäße Plasmidvektor insbesondere auch zur Expression der Fusionsproteine im Bronchialepithel führt, sind erfindungsgemäß auch Nucleotidsequenzen in dem erfindungsgemäßen Plasmidvektor vorgesehen, die therapeutisch sinnvolle Proteine zur Behandlung von Mukoviszidose (zystische Fibrose der Lunge) codieren. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Behandlung von Mukoviszidose.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass der erfindungsgemäße Plasmidvektor als konstitutiv exprimierenden Promotor den humanen beta-Aktin-Promotor enthält, der insbesondere kein Intron umfasst. In einer bevorzugten Variante dieser Ausführungsform umfasst der humane beta-Aktin-Promotor die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 10. Ent-

sprechend dieser erfindungsgemäßen Variante des Promotor-Bereichs wird diese einfachste Promotorstruktur ohne Intron als Plasmidvektor pCURE2basic bezeichnet.

- 5 In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass der Plasmidvektor einen Expressionsverstärker, insbesondere einen Enhancer, besonders bevorzugt den CMV-enhancer aufweist. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Plasmidvektors umfasst der konstitutiv exprimierende Promotor in 5'- zu 3'-Richtung eine den CMV-enhancer codierende Nucleotidsequenz und den humanen beta-Aktin-Promotor. In einer bevorzugten Variante umfasst die den CMV-enhancer codierende Nucleotidsequenz die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 9.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Variante umfasst der humane beta-Aktin-Promotor sein natives Intron. Der so bereitgestellte erfindungsgemäße Plasmidvektor wird als pCURE2natin bezeichnet.

- 20 In einer weiteren Variante umfasst der im erfindungsgemäßen Plasmidvektor enthaltene humane beta-Aktin-Promotor ein verkürztes Intron, das die nativen 5'- und 3'-Spleissstellen und ein verkürztes „stuffer“-Fragment. In einer weiteren Variante umfasst das verkürzte Intron des humanen beta-Aktin-Promotors zusätzlich eine den SV40-enhancer codierende Nucleotidsequenz. Erfindungsgemäß bevorzugt ist dabei das „stuffer“-Fragment soweit verkürzt, so dass es lediglich die „branch site“ umfasst.
- 30 Insbesondere ist das „stuffer“-Fragment um 700 bis 800 bp verkürzt, besonders bevorzugt ist das stuf-

fer-Fragment um 761 bp verkürzt. Die so bereitgestellten erfindungsgemäßen Plasmidvektoren werden als pCURE2minin (beinhaltend das verkürzte Intron) beziehungsweise pCURE2enhin (beinhaltend das verkürzte Intron und den SV40-enhancer) bezeichnet.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Plasmidvektors ist die Polyadenylierungsstelle das SV40-Polyadenylierungssignal, in einer weiteren Variante ist die Polyadenylierungsstelle ein BGH-Polyadenylierungssignal (= BGHpA) des bovinen Wachstumshormons (bovine growth hormone). Besonders bevorzugt ist die Polyadenylierungsstelle das BGH-Polyadenylierungssignal umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 6.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist in 5'- zu 3'-Richtung nach dem konstitutiv exprimierenden Promotor und unmittelbar vor der eine Translokationssequenz codierenden Nucleotidsequenz eine Ribosomenbindestelle (RBS) mit Startkodon lokalisiert.

Erfindungsgemäß außerdem bevorzugt ist in dem erfindungsgemäßen Plasmidvektor in 5'- zu 3'-Richtung nach dem konstitutiv exprimierenden Promotor und vor der eine Translokationssequenz codierenden Nucleotidsequenz eine multiple Clonierungsstelle für die Insertion mindestens eines regulatorischen Elementes lokalisiert. In einer bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Plasmidvektors ist das mindestens eine regulatorische Element ein gewebespezifischer Promotor.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sieht die Erfindung vor, dass der erfindungsgemäße Plasmidvektor mindestens ein Resistenzgen, insbesondere ein bakterielles Resistenzgen enthält. In einer bevorzugten Variante ist dieses bakterielle Resistenzgen das amp^{R} -Gen für die Ampicillin-Resistenz. In einer alternativen Variante ist das bakterielle Resistenzgen ein kan^{R} -Gen für Kanamycin-Resistenz. Bevorzugt umfasst das kan^{R} -Gen die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 7.

Die Erfindung sieht in einer weiteren Ausführungsform vor, dass das mindestens eine Resistenzgen mindestens eine Schnittstelle zum Linearisieren und/oder Inaktivieren des Resistenzgens aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform ist es bevorzugt, dass der Plasmidvektor mindestens einen Replikationsursprung für die Plasmidanzucht insbesondere in Bakterien aufweist. In einer bevorzugten Variante umfasst der Replikationsursprung die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 8.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist der Plasmidvektor aus dem bekannten Vektor pcDNA 3.1(-) abgeleitet und ist insbesondere 3,4 kbp groß (Figur 1). In einer besonders bevorzugten alternativen Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Plasmidvektor lediglich 2,8 kbp groß und umfasst insbesondere bevorzugt die Nucleotidsequenz SEQ ID Nr. 11 (Figur 2).

Die Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform auch Wirtszellen oder Zellen einer Zellkultur, enthaltend mindestens einen Plasmidvektor

der vorliegenden Erfindung. Eine derartige Wirtszelle kann unter anderem eine bakterielle Zelle, eine Hefezelle, eine tierische Zelle, zum Beispiel eine Säuger- oder Insektenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur genetischen Modifizierung einer Zelle, zum Beispiel einer tierischen oder menschlichen Zelle, umfassend das Inkontaktbringen der Zelle mit einem Vektor, insbesondere Plasmidvektor, gemäß der vorliegenden Erfindung unter Bedingungen, die eine Aufnahme des Vektors, insbesondere Plasmidvektors, in die Zelle, insbesondere das Genom der Zelle erlauben.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung genetisch modifizierter Zellen, wobei die genetisch zu modifizierenden Zellen mit einem Vektor, insbesondere Plasmidvektor, der vorliegenden Erfindung in Kontakt gebracht und dabei transient oder stabil transformiert werden.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines Vektors, insbesondere Plasmidvektors, der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Präparates, insbesondere eines pharmazeutischen Präparates für die Gentherapie, insbesondere die somatische Gentherapie.

Die Erfindung betrifft daher auch Präparate, insbesondere pharmazeutische Präparate, enthaltend mindestens einen Vektor, insbesondere Plasmidvektor, der vorliegenden Erfindung, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele, der dazugehörigen Figuren und Sequenzprotokolle näher erläutert.

Im Sequenzprotokoll stellen dar

SEQ ID Nr. 1 die 33 die HIV-TAT-Leitpeptidsequenz (SEQ ID Nr. 2) codierenden Nucleotide,

10 SEQ ID Nr. 2 die 11 Aminosäuren der natürlich vorkommenden HIV-TAT-Leitpeptidsequenz,

SEQ ID Nr. 3 die 49 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des die RBS, die HIV-TAT-Region und NotI-Clonierungsstelle umfassenden Bereichs von pCURE,

15 SEQ ID Nr. 4 die Aminosäuresequenz der Helix der Homöodomäne von Antennipedia,

SEQ ID Nr. 5 die 11 Aminosäuren der modifizierten, nicht natürlich vorkommenden HIV-TAT-Leitpeptidsequenz,

20 SEQ ID Nr. 6 die 235 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des BGH-Polyadenylierungssignals,

SEQ ID Nr. 7 die 1189 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des Kanamicin-Resistenzgens kan^R,

SEQ ID Nr. 8 die 661 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des Replikationsursprungs (origin of replication),

5 SEQ ID Nr. 9 die 348 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des CMV-enhancer,

SEQ ID Nr. 10 die 377 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des beta-Aktin-Promotors,

10 SEQ ID Nr. 11 die 2810 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des erfindungsgemäßen Plasmidvektors pCURE2basic (ohne eine clonierte gentherapeutisch sinnvolle Nucleotidsequenz),

15 SEQ ID Nr. 12 zeigt die 40 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des die modifizierte HIV-TAT-Leitpeptidsequenz (SEQ ID Nr. 5) codierenden „N-linker“ aus synthetischen Oligonucleotiden 2NF und 2NR und

20 SEQ ID Nr. 13 die 37 Nucleotide enthaltende Nucleotidsequenz des die modifizierte HIV-TAT-Leitpeptidsequenz (SEQ ID Nr. 5) codierenden „C-linker“ aus synthetischen Oligonucleotiden 2CF und 2CR.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 eine grafische Darstellung des Plasmids pCURE,

25 Figur 2 eine grafische Darstellung des Plasmids pCURE2basic,

- Figur 3 eine *in situ* Färbung einer erfindungsgemäß transformierten Gehirnhälfte und eine Kontrolle,
- 5 Figur 4 Dünnschnitte von Leber und Gehirn (jeweils Negativkontrolle und erfindungsgemäß transformiert),
- 10 Figur 5 Dünnschnitte eines erfindungsgemäß transformierten Gehirns nach intrahepatischer Injektion von pCURE2Cbasic-lacZ (Figur 5A) und Dünnschnitt des Gehirns eines unbehandelten Kontrolltieres (Figur 5B),
- 15 Figur 6 Dünnschnitte einer Lunge mit erfindungsgemäß transformiertem Bronchialepithel nach intrahepatischer Injektion von pCURE2Cbasic-lacZ (Figur 6A) und Dünnschnitt der Lunge eines unbehandelten Kontrolltieres (Figur 6B).

Beispiel 1: Herstellung des Plasmids pCURE

- 20 Der Expressionsvektor pcDNA 3.1(-) von Invitrogen (Kat.-Nr. V 795-20) wurde mit EcoRV und NaeI gespalten. Anschließend wurde das Plasmid religiert und die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID Nr. 3 in die NotI-Stelle inseriert.
- 25 Figur 1 stellt grafisch das Plasmid pCURE in PVU I-linearisierter Form (von links nach rechts in 5'- zu 3'-Orientierung) dar. Die in Figur 1 verwendeten Abkürzungen bedeuten:

| | | |
|----|------------------|---|
| | P _{CMV} | CMV-Promotor zur zelltypunabhängigen Expression (Quelle: pcDNA3.1(-)) |
| 5 | MCS | Multiple Clonierungsstelle für gewebespezifische Promotoren: NheIU, PmeI, DraII, ApaI, XbaI, XhoI |
| | RBS | Ribosomale Bindungsstelle mit Startcodon |
| | TAT | TAT leader-Sequenz als Translokationssignal für interzellulären Transport |
| 10 | NotI | Insertionsstelle (Clonierungsstelle) für zum Beispiel therapeutisch sinnvolle cDNA |
| | SV40pA | SV40 Polyadenylierungssignal und Transkriptionstermination |
| 15 | pMB1 | Replikationsursprung (origin of replication) ("pUC-derived") für Plasmidanzucht in Bakterien |
| | amp | Ampicillin-Resistenzgen |
| | PvuI | Schnittstelle zum Linearisieren und Inaktivieren der Ampicillin-Resistenz |
| 20 | pCURE1 | hat ohne inserierte DNA eine Größe von 3,4 kbp. |

Figur 1 kann entnommen werden, dass zwischen P_{CMV}, also dem CMV-Promotor, und der ribosomalen Bindungsstelle eine multiple Clonierungsstelle MCS angeordnet ist. In 3'-Richtung davon folgen eine TAT-

leader-Sequenz, eine NotI-Insertionsstelle sowie die SV40pA Polyadenylierungsstelle.

Beispiel 2: Herstellung des Plasmids pCURE-lacZ

5 pCURE-lacZ wurde konstruiert durch Clonierung des lacZ-Gens aus *E.coli* in die NotI-Schnittstelle von pCURE (Figur 1). Das resultierende Plasmid pCURE-lacZ enthält die Aminosäuren 8 bis 1023 der *E.coli* beta-Galaktosidase, die Xgal zu einem blauen Farbstoff umsetzen. Diese katalytische Domäne liegt im Leseraster hinter der HIV-TAT-Translokations-Leader-Sequenz, welche einen interzellulären Transport ermöglicht.

15 Beispiel 3: Intraperitoneale Applikation von pCURE-lacZ in Mäusen

pCURE-lacZ wurde im mg-Maßstab steril und pyrogenfrei aus dem *E.coli*-Stamm JM109 isoliert (Qiagen endomaxiprep kit) und nach Konzentrationsbestimmung auf 150 mM Phosphatpuffer, pH 7,0, eingestellt (dieser Puffer dient auch als Injektionslösung für die Kontrollmäuse).

Die Injektionen mit pCURE-lacZ erfolgten an gesunden Mäusen. Neugeborenen Mäusen wurden 50 µg pCURE-lacZ in 50 µl Phosphatpuffer direkt in die Leber gespritzt. Nach 96 h wurden die Tiere getötet und verschiedene Organe entnommen. Hirn, Leber, Herz und Lunge wurden in toto in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Obengenannte Organe wurden in Xgal-Färbelösung (Stratagene Xgal *in situ* detection kit) bei 37°C über Nacht inkubiert und nach Einbettung in Paraffin für Dünnschnitte von 10-40 µm verwendet.

5 *Ergebnisse:*

Figur 3 zeigt *in toto* gefärbte Gehirnhälften nach Xgal-Inkubation. Links: Injektion von 50 µg pCURE-lacZ. Rechts: Injektion von 50 µl Phosphatpuffer (Negativkontrolle).

10 Figur 4 zeigt paraffin-fixierte Dünnschnitte der entsprechenden Organe. a) und b) Lebergewebe: a) Negativkontrolle b) Injektion von pCURE-lacZ. c) und d) Gehirn: c) Negativkontrolle d) Injektion von pCURE-lacZ.

15 Deutlich ist zu erkennen, dass die erfindungsgemäßen Vektoren erfolgreich in das Gewebe transferriert, dort exprimiert und die Genprodukte auch in nicht transfizierte Organe, insbesondere das Gehirn, transportiert wurden.

20

Beispiel 4: Die Plasmide pCURE2basic, pCURE2nativ, pCURE2minin und pCURE2enhin

Der auf dem Therapieplasmid pCURE gemäß Beispiel 1 vorhandene CMV-Promotor wird ersetzt durch verschiedene Varianten des menschlichen beta-Aktin-Promotors. Beide Promotoren werden ubiquitär, also in allen Organen exprimiert. Ausgehend von diesen Vorversuchen wird zunächst der menschliche beta-Aktin-Promotor unter Verwendung genomischer Klone

25

und PCR-Technologien zur Verwendung in den Therapieplasmiden isoliert. Das menschliche beta-Aktin-Gen wird lebenslang ubiquitär exprimiert, eine Promotor-Inaktivierung wird so umgangen. Um einerseits
5 maximal mögliche Expressionsraten zu erhalten und andererseits die Größe des Gesamt-Plasmids so klein wie möglich zu halten -da dies wiederum unmittelbar die Transfektionsraten beeinflusst- wird erfindungsgemäß der menschliche beta-Aktin-Promotor in
10 insgesamt vier verschiedenen Varianten des Promotorbereichs verwendet:

- a) CMV-enhancer + beta-Aktin-Promotor + BGHpA (kein Intron)
- b) CMV-enhancer + beta-Aktin-Promotor + natives beta-Aktin-Intron + BGHpA (Intron)
15
- c) CMV-enhancer + beta-Aktin-Promotor + verkürztes beta-Aktin-Intron + BGHpA (mini-Intron)
- d) CMV-enhancer + beta-Aktin-Promotor + beta-Aktin-Intron, worin die interne Intron-Sequenz durch
20 das SV40-enhancer-Element ersetzt ist + BGHpA (enhancer-Intron)

Zu a) der „reine“ Promotorbereich enthält die sogenannten „CAT“- und „TATA“-Boxen zur Transkriptionsinitiation und stellt die kleinste der vier Möglichkeiten dar.
25

Zu b) diese Version enthält zusätzlich zum Promotor ein Intron vor dem Start-Codon beziehungsweise der kodierenden Sequenz. Das Intron besteht aus einer 5'- und 3'-Spleißstelle sowie einem internen „stuf-

fer"-Fragment, das lediglich für einen gewissen Abstand zwischen den beiden Spleißstellen sorgt. Da das Intron keine kodierende Sequenz enthält, kann es nur regulatorische Eigenschaften auf der Ebene
5 der Transkription haben.

Zu c) Das mini-Intron enthält die nativen 5'- und 3'-Spleißstellen, der „stuffer“ ist jedoch stark verkürzt, um die Größe des Gesamtplasmids gering zu halten. Der „stuffer“ ist dabei so verkürzt, dass
10 die sogenannte „branch site“ noch enthalten ist. Insbesondere ist der „stuffer“ des Mini-Introns um 761 bp verkürzt.

Zu d) Das enhancer-Intron entspricht dem mini-Intron zuzüglich dem SV40-enhancer-Bereich, der
15 seinerseits als „stuffer“ dient und somit einer Anforderung an den Abstand zwischen den beiden Spleißstellen Rechnung trägt. Andererseits erfüllt er zusätzlich zu dem passiven nativen „stuffer“ eine Verstärkungsfunktion der Expression. Nach der
20 Transkription wird dieser bis dahin zweimal nützliche Bereich (Kernimport und Abstandshalter) nicht mehr benötigt und wie das native Intron herausgespleißt.

Struktur der pCURE2-Plasmide:

25 Der Promotorbereich bestehend aus dem CMV-enhancer (native Sequenz aus dem Cytomegalovirus, GenBank M60321), verschiedenen Teilen des humanen beta-Aktin-Promotors (native Sequenz aus dem humanen Genom, Genbank AC006483), in einer der oben beschriebenen Varianten aus dem SV40 enhancer-Element (na-
30

tive Sequenz aus dem Simian Virus 40, GenBank NC001669), bildet zusammen mit der BGH-Polyadenylierungsstelle (native Sequenz aus dem Rindergenom, GenBank J00008) die Expressionskassette des Therapieplasmids. Dieses besteht weiterhin aus einem Replikationsursprung (origin of replication, ori) zur Plasmidvermehrung in Bakterien insbesondere die native Sequenz aus pUC9 (identisch zu pUC13 GenBank L09130) sowie insbesondere einer Kanamycin-Resistenz (nativ aus pACYC177, GenBank X06402) zur Antibiotika-Selektion in Bakterien.

Die Kanamycin-Resistenz hat gegenüber der in pCURE (Beispiel 1) verwendeten Ampicillin-Resistenz den weiteren Vorteil, dass ihre Verwendung auch für klinische Prüfungen ab der Phase III zugelassen ist. Sämtliche der Sequenzelemente von pCURE2 wurden einzeln hergestellt. Es wurde also nicht wie bei pCURE ein Vorläuferplasmid wie pCDNA3.1 verwendet.

Darüber hinaus werden sämtliche Elemente so miteinander verknüpft, dass stets eine einzige (unique) NotI-Schnittstelle zur Einklonierung weiterer Elemente beziehungsweise einer kodierenden Sequenz zur Verfügung steht. Dies beinhaltet die gentechnische Beseitigung von NotI-Schnittstellen in der nativen beta-Aktin-Promotor-Sequenz. Die so verknüpften Elemente (Expressionskassette plus Replikationsursprung plus Kanamycin-Resistenzgen) bilden den Therapievektor pCURE2. Entsprechend den oben beschriebenen vier Varianten des Promotor-Bereichs beinhaltet pCURE2basic die einfachste Promotorstruktur a (kein Intron). pCURE2natin beinhaltet

Version b (natives Intron). pCURE2minin beinhaltet
Version c (mini-Intron). pCURE2enhin beinhaltet
Version d (enhancer-Intron).

Verwendung der Translokationssequenzen:

- 5 Auf Proteinebene durchgeführte Experimente zeigen,
dass die Translokationseigenschaft der HIV-TAT-
Proteintransduktionsdomäne (PTD) durch gezielte
Aminosäure-Austausche verbessert werden kann (Ho et
al., Cancer Research 2001, 61:474-477). Die besten
10 Ergebnisse erzielt die (nicht natürlich vorkommen-
de) Sequenz YARAAARQARA (SEQ ID Nr. 5). Diese Se-
quenz wird in den oben beschriebenen vier Grundva-
rianten von pCURE2 verwendet, um die auf dem
Plasmidvektor kodierten Proteine zu fusionieren mit
15 dieser die Translokationseigenschaft der Fusions-
proteine verursachenden Domäne.

- Es werden die oben beschriebenen vier Varianten von
pCURE2 jeweils konstruiert wahlweise für die Kodie-
rung von Proteinen mit N- als auch mit C-terminaler
20 Proteintransduktionsdomäne nach Einklonierung ent-
sprechender kodierender Sequenzen in die unique No-
tI-Schnittstelle. Hieraus ergeben sich insgesamt 8
Möglichkeiten und Therapieplasmide:

- | | | |
|----|--------------|--------------|
| 25 | pCURE2Cbasic | pCURE2Nbasic |
| | pCURE2Cnatin | pCURE2Nnatin |
| | pCURE2Cminin | pCURE2Nminin |
| | pCURE2Cenhin | pCURE2Nenhin |

Das basale Therapieplasmid pCURE2basic mit seinen
insgesamt 8 Varianten ist in Figur 2 dargestellt.

Herstellung der pCURE2-Plasmide:

Die Sequenz für die Kanamycin-Resistenz (kan^R) wird aus pACYC177 PCR amplifiziert. Der origin of replication (ori) wird aus pUC9 mittels PCR amplifiziert. Diese beiden Sequenzen werden unter Verwendung von Schnittstellen, welche in die PCR-Primer eingebaut wurden, miteinander verknüpft, wobei erfindungsgemäß eine unique NotI-Schnittstelle entsteht.

10 In diese wird die CMV-enhancer-Sequenz, die aus pCURE (Beispiel 1) mittels PCR amplifiziert worden ist, eingebaut, wobei die PCR-primer erfindungsgemäß so gewählt werden, dass nur in 3'-Richtung vom Enhancer (downstream) die NotI-Schnittstelle restauriert wird und somit unique bleibt.

Die BGHpA wird aus genomischer Rinder-DNA PCR amplifiziert und nach dem Enhancer in die unique NotI-Schnittstelle eingebaut, wobei die PCR-Primer erfindungsgemäß so gewählt worden sind, dass nur die NotI-Schnittstelle vor der BGHpA (upstream) restauriert wird.

Zwischen Enhancer und Polyadenylierungsstelle werden je nach Promotor-Version erfindungsgemäß verschiedene Bereiche des menschlichen beta-Aktin-Promotors beziehungsweise der SV40 enhancer-Region, die jeweils zuvor aus genomischer DNA amplifiziert worden sind, eingebaut. Dieser Einbau erfolgt nach dem oben ausgeführten Prinzip, wobei Schnittstellen so in die PCR-Primer eingebaut werden, dass jeweils nur die 3'-NotI-Schnittstelle (downstream) restau-

riert wird und somit das Plasmid für die nächste Ligation wieder mit NotI linearisiert werden kann.

Nach dem gleichen Prinzip werden die erfindungsgemäßen N- oder C-linker eingebaut, die jeweils komplett synthetisiert worden sind. Der N-linker versieht erfindungsgemäß das Fusionsprotein mit einer N-terminalen Proteintranslokationsdomäne (PTD), die 3'-NotI-Schnittstelle bleibt dabei für den Einbau weiterer Sequenzen erhalten. Der C-linker versieht erfindungsgemäß das Fusionsprotein mit einer C-terminalen PTD, wobei die 5'-NotI-Schnittstelle erhalten bleibt.

Herstellung von pCURE2Nbasic-lacZ und pCURE2Cbasic-lacZ:

Die lacZ-Kassette wurde für pCURE2Nbasic-lacZ aus pCURE-lacZ (Beispiel 2) mit Restriktionsenzymen isoliert beziehungsweise für pCURE2Nbasic-lacZ aus pCURE-lacZ (Beispiel 2) PCR-amplifiziert.

Beispiel 5: Intrahepatische Applikation von pCURE2Nbasic-lacZ in Mäusen

Zwei Tage alte Mäuse (Wildtyp) wurden mit 50 µg des isolierten erfindungsgemäßen Plasmidvektors enthaltend das lacZ-Gen in 50 µl eines 150 mM Phosphatpuffers mit pH 7,0 intrahepatisch injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen und nach einer Xgal-Färbung wurden Paraffinschnitte der Lunge und des Gehirns angefertigt. Gleichzeitig wurden von nichtinjizierten gleich alten Kontrolltieren ebenfalls Paraffinschnitte von

Gehirn und Lunge angefertigt. Die Xgal-Färbung erfolgte gemäß Beispiel 3. Alle Vergrößerungen der Paraffinschnitte sind hundertfach und ohne Gegenfärbung.

5 *Ergebnisse:*

Die Figuren 5A und 5B zeigen *in toto* gefärbte Gehirnhälften nach Xgal-Inkubation. Figur 5A: Nach Injektion von 50 µg des Plasmidvektors. Figur 5B: nach Injektion von 50 µl Phosphatpuffer (Negativ-
10 kontrolle).

Zu sehen ist bei den Hirnschnitten rechts der stark angefärbte Plexus choroideus sowie links die angefärbten Neuronen der Hirnrinde. Klar zu erkennen ist, dass in den mit den erfindungsgemäßen Plasmid-
15 vektor behandelten Tieren die Neuronen blau gefärbt sind; dort wurde das lacZ-Gen erfindungsgemäß transformiert und exprimiert.

Die spezifische Transformation und Expression des Marker-Proteins macht deutlich, dass der erfindungsgemäße Plasmidvektor zur somatischen Gentherapie von Hirn-Neuronen geeignet ist. Die Blut-Hirnschranke wird dabei - besonders überraschend -
20 von den erfindungsgemäßen Fusionsproteinen überwunden.

Die Figuren 6A und 6B zeigen die Ergebnisse für die Lunge: Bei den Lungenschnitten ist zentral ein Bronchus mit stark angefärbtem Epithel zu sehen. Aufgrund der ausbleibenden Anfärbung in der Negativ-Kontrolle ist diese Struktur dort nur schwer zu
30 erkennen. Die spezifische Anfärbung des Bronchiale-

pithels zeigt, dass das mit dem erfindungsgemäßen Plasmidvektor in das Bronchialepithel transformierte lacZ-Gen exprimiert wird.

Die spezifische Anfärbung des Bronchialepithels
5 macht die Verwendung des erfindungsgemäßen Plasmidvektors insbesondere für eine Behandlung der zystischen Fibrose der Lunge (Mukoviszidose) geeignet.

Ansprüche

1. Vektor für gentherapeutische Zwecke, umfassend
5 mindestens eine Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nucleotidsequenzen codierend für das HSV VP22-Protein, eine HIV-TAT Proteintransduktionsdomäne oder das Antennipe-
10 dia-Peptid.
2. Vektor nach Anspruch 1, der ein Plasmidvektor, ein viraler Vektor oder ein Liposom ist.
3. Plasmidvektor für gentherapeutische Zwecke nach
15 Anspruch 2, umfassend operativ miteinander verknüpft in 5'- zu 3'-Richtung mindestens einen konstitutiv exprimierenden Promotor, die eine Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz, eine NotI-Clonierungsstelle für die Insertion einer gentherapeutisch sinnvollen Nucleotidsequenz und eine Polyadenylierungsstelle.
20
4. Plasmidvektor für gentherapeutische Zwecke nach
25 Anspruch 3, umfassend operativ miteinander verknüpft in 5'- zu 3'-Richtung den mindestens einen konstitutiv exprimierenden Promotor, eine Ribosomenbindestelle codierende Nucleotidsequenz, eine das HIV-TAT-Leitpeptid mit den Aminosäuren YGRKKRRQRRR (SEQ ID Nr. 2) codierende Nucleotidsequenz, eine NotI-Clonierungsstelle für die Insertion einer

gentherapeutisch sinnvollen Nucleotidsequenz und eine Polyadenylierungsstelle.

- 5 5. Plasmidvektor nach Anspruch 4, wobei der konstitutiv exprimierende Promotor der CMV-Promotor ist.
6. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 4 oder 5, wobei die Polyadenylierungsstelle die SV40pA-Stelle ist.
- 10 7. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei zwischen dem konstitutiv exprimierenden Promotor und der die Ribosomenbindestelle codierenden Nucleotidsequenz eine multiple Clonierungsstelle für die Insertion mindestens eines regulatorischen Elementes lokalisiert ist.
- 15 8. Plasmidvektor nach Anspruch 7, wobei das mindestens eine regulatorische Element ein gewebe-spezifischer Promotor ist.
9. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 8, wobei der Plasmidvektor 3,4 kb groß ist.
- 20 10. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 9, wobei in der NotI-Clonierungsstelle im Leseras-ter zu dem HIV-TAT-Leitpeptid eine gentherapeu-tisch sinnvolle Nucleotidsequenz inseriert ist.
- 25 11. Plasmidvektor nach Anspruch 10, wobei die gentherapeutisch sinnvolle Nucleotidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Faktor VIII-Gen, tPA-Gen und Molybdän-Cofaktor-Gen.

12. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei der Plasmidvektor ein Resistenzgen enthält.
13. Plasmidvektor nach Anspruch 12, wobei das Resistenzgen das amp^R-Gen ist.
14. Plasmidvektor nach Anspruch 12 oder 13, wobei das Resistenzgen mindestens eine Schnittstelle zum Linearisieren und Inaktivieren des Resistenzgens aufweist.
15. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 14, wobei der Plasmidvektor einen Enhancer aufweist.
16. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 15, wobei der Plasmidvektor einen Replikationsursprung für die Plasmidanzucht in Bakterien enthält.
17. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 16, wobei die Translokationssequenz die Aminosäuresequenz des HIV-TAT-Leitpeptids mit den Aminosäuren YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2) umfasst.
18. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 16, wobei die Translokationssequenz eine Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 1 durch Addition, Deletion oder Austausch von mindestens einer Aminosäure, bevorzugt von 6 Aminosäuren, hervorgeht.

19. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 16, wobei die Translokationssequenz das modifizierte HIV-TAT-Leitpeptid mit den Aminosäuren YARAAARQARA (SEQ ID NO: 5) umfasst.
- 5 20. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 16, wobei die Translokationssequenz eine modifizierte Aminosäuresequenz umfasst, die aus der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 5 durch Addition, Deletion oder Austausch von mindestens einer
10 Aminosäure, bevorzugt von einer bis drei Aminosäuren, hervorgeht.
21. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 20, wobei die die Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz in einer als „N-linker“
15 fungierenden Nucleotidsequenz enthalten ist.
22. Plasmidvektor gemäß Anspruch 21, wobei die als „N-linker“ fungierende Nucleotidsequenz die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 12 umfasst.
- 20 23. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 20, wobei die die Translokationssequenz codierende Nucleotidsequenz in einer als „C-linker“ fungierenden Nucleotidsequenz enthalten ist.
24. Plasmidvektor gemäß Anspruch 23, wobei die als „C-linker“ fungierende Nucleotidsequenz die
25 Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 13 umfasst.
25. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 24, wobei der konstitutiv exprimierende Promotor der CMV-Promotor ist.

26. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 24, wobei der konstitutiv exprimierende Promotor der humane beta-Actin-Promotor ist.
- 5 27. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 24, wobei der konstitutiv exprimierende Promotor in 5'- zu 3'-Richtung eine den CMV-enhancer codierende Nucleotidsequenz und den humanen beta-Actin-Promotor umfasst.
- 10 28. Plasmidvektor nach Anspruch 27, wobei die den CMV-enhancer codierende Nucleotidsequenz die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 9 umfasst.
- 15 29. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 26 bis 28, wobei der humane beta-Actin-Promotor dadurch gekennzeichnet ist, dass er kein Intron umfasst.
30. Plasmidvektor nach Anspruch 29, wobei der humane beta-Actin-Promotor die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 10 umfasst.
- 20 31. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 26 bis 28, wobei der humane beta-Actin-Promotor dadurch gekennzeichnet ist, dass er sein natives Intron umfasst.
- 25 32. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 26 bis 28, wobei der humane beta-Actin-Promotor dadurch gekennzeichnet ist, dass er ein verkürztes Intron, beinhaltend die nativen 5'- und 3'-Spleissstellen und ein verkürztes „stuffer“-Fragment, umfasst.

33. Plasmidvektor nach Anspruch 31, wobei das verkürzte Intron zusätzlich eine den SV40-enhancer codierende Nucleotidsequenz umfasst.
- 5 34. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 32 oder 33, wobei das stark verkürzte „stuffer“-Fragment so weit verkürzt ist, dass es lediglich die „branch site“ umfasst.
- 10 35. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 32 bis 34, wobei das „stuffer“-Fragment um 700 bis 800 bp verkürzt ist.
36. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 32 bis 34, wobei das „stuffer“-Fragment um 761 bp verkürzt ist.
- 15 37. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 35, wobei die Polyadenylierungsstelle das SV40-Polyadenylierungssignal ist.
38. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 37, wobei die Polyadenylierungsstelle ein BGH-Polyadenylierungssignal ist.
- 20 39. Plasmidvektor nach Anspruch 38, wobei das BGH-Polyadenylierungssignal die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 6 umfasst.
- 25 40. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 39, wobei in 5'- zu 3'-Richtung nach dem konstitutiv exprimierenden Promotor und unmittelbar vor der eine Translokationssequenz codierenden Nucleotidsequenz eine Ribosomenbindestelle mit Startkodon lokalisiert ist.

41. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 40, wobei in 5'- zu 3'-Richtung nach dem konstitutiv exprimierenden Promotor und vor der eine Translokationssequenz codierenden Nucleotidsequenz eine multiple Clonierungsstelle für die Insertion mindestens eines regulatorischen Elementes lokalisiert ist.
42. Plasmidvektor nach Anspruch 41, wobei das mindestens eine regulatorische Element ein gewebespezifischer Promotor ist.
43. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 42, wobei der Plasmidvektor mindestens ein Resistenzgen enthält.
44. Plasmidvektor nach Anspruch 43, wobei das mindestens eine Resistenzgen das amp^{R} -Gen für Ampicillin-Resistenz ist.
45. Plasmidvektor nach Anspruch 43, wobei das mindestens eine Resistenzgen ein kan^{R} -Gen für Kanamycin-Resistenz ist.
46. Plasmidvektor nach Anspruch 45, wobei das kan^{R} -Gen die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 7 umfasst.
47. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 43 bis 46, wobei das mindestens eine Resistenzgen mindestens eine Schnittstelle zum Linearisieren und Inaktivieren des Resistenzgens aufweist.

48. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 48, wobei der Plasmidvektor mindestens einen Replikationsursprung für die Plasmidanzucht insbesondere in Bakterien enthält.
- 5 49. Plasmidvektor nach Anspruch 48, wobei der mindestens eine Replikationsursprung die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 8 umfasst.
- 10 50. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 4 bis 49, wobei der Plasmidvektor aus dem Vektor pcDNA3.1(-) abgeleitet ist.
51. Plasmidvektor nach Anspruch 50 wobei der Plasmidvektor 3,4 kbp groß ist
52. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 49, wobei der Plasmidvektor 2,8 kbp groß ist.
- 15 53. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 51, wobei der Plasmidvektor die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 11 beinhaltet.
- 20 54. Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 3 bis 53, wobei in der NotI-Clonierungsstelle im Leseraster zu einer Translokationssequenz eine gentherapeutisch sinnvolle Nucleotidsequenz inseriert ist.
- 25 55. Plasmidvektor nach Anspruch 54, wobei die gentherapeutisch sinnvolle Nucleotidsequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Faktor VIII-Gen, tPA-Gen und Molybdän-Cofaktor-Gen.

56. Wirtszelle, enthaltend einen Plasmidvektor nach einem der Ansprüche 2 bis 55.
57. Wirtszelle nach Anspruch 56, wobei die Wirtszelle eine bakterielle Zelle, eine Insektenzelle, eine Säugerzelle oder eine menschliche Zelle ist.
58. Verfahren zur genetischen Modifizierung einer Zelle, umfassend das Inkontaktbringen der Zelle mit einem Vektor gemäß einem der Ansprüche 1 bis 55 unter Bedingungen, die geeignet sind, die Aufnahme des Vektors in die Zelle zu bewirken.
59. Verfahren zum Einführen genetischer Informationen in eine Zelle, umfassend das Einfügen der genetischen Informationen in einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 55 und das Inkontaktbringen der Zelle mit dem Plasmidvektor unter Bedingungen, die geeignet sind, die Aufnahme der genetischen Information in die Zelle zu bewirken.
60. Verfahren nach einem der Ansprüche 58 oder 59, wobei die Zelle eine bakterielle, menschliche oder tierische Zelle ist.
61. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 55, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

62. Verwendung eines Plasmidvektors nach einem der Ansprüche 1 bis 55 für die Herstellung eines Präparates für die somatische Gentherapie.

5 63. Verwendung nach Anspruch 62 für die Herstellung eines Präparates zur Behandlung einer Molybdän-Cofaktor-Defizienz.

64. Verwendung nach Anspruch 62 für die Herstellung eines Präparates zur Behandlung der zystischen Fibrose.

10

pCURE: Skizze des mit PvuI linearisierten Plasmids (3.4 kbp)

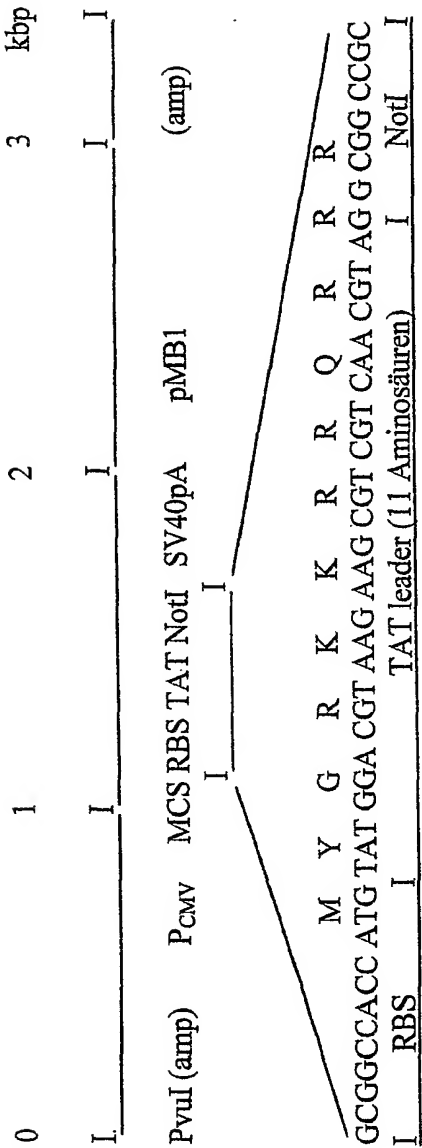
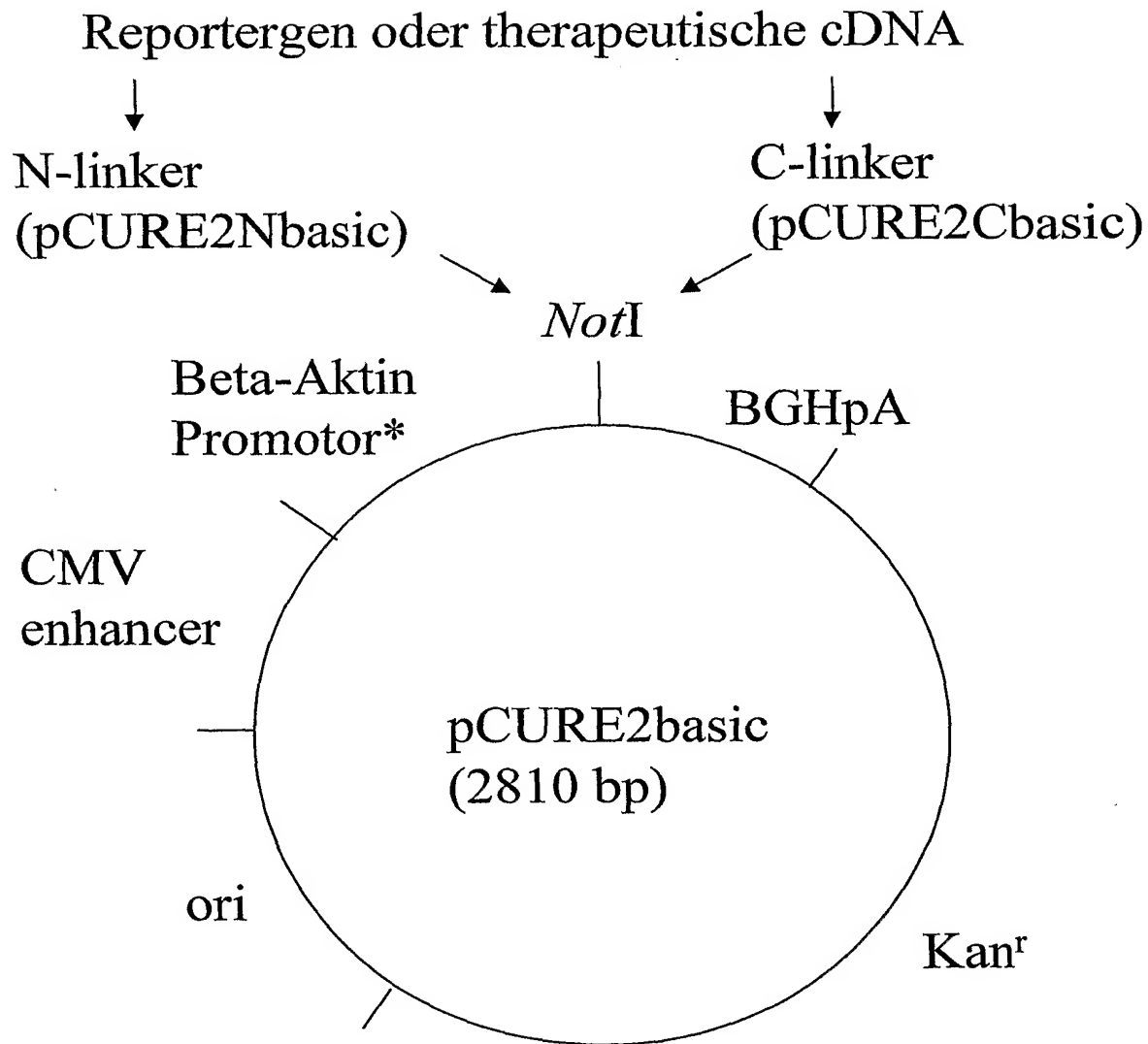


FIG. 1



| | | | | |
|--------------|----------|----|----------|----|
| | Promotor | | | |
| *pCURE2basic | Promotor | 5' | Intron | 3' |
| *pCURE2natin | Promotor | 5' | | 3' |
| *pCURE2minin | Promotor | 5' | | 3' |
| *pCURE2enhin | Promotor | 5' | enhancer | 3' |

FIG. 2



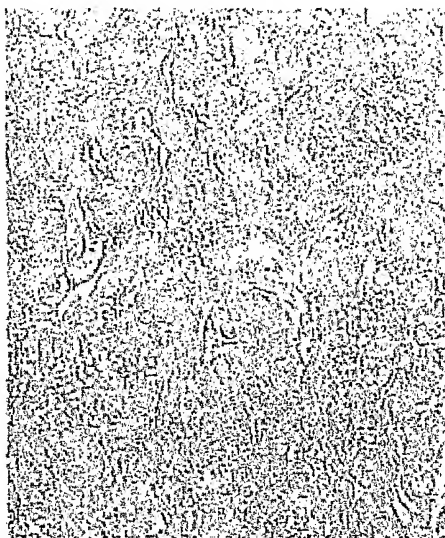
FIG. 3



a



b



c



d

FIG. 4



FIG. 5 A



FIG. 5 B



FIG. 6 A



FIG. 6 B

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Dr. Reiss, Jochen

<120> pCURE

<130> 24557

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 33

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 1

tatggacgta agaagcgtcg tcaacgtagg cgg

33

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 2

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1

5

10

<210> 3

<211> 49

<212> DNA

<213> Human immunodeficiency virus

<400> 3

gcgggccacca tgtatggacg taagaagcgt cgtcaacgta ggcgggccgc

49

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Antennipedia

<400> 4

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gly Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial HIV-TAT PTD

<400> 5

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
 1 5 10

<210> 6

<211> 235

<212> DNA

<213> bovine growth hormone polyadenylation

<400> 6

gcgggcgcgtg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc 60
 ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg 120
 cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg 180
 gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctgg gtcgg 235

<210> 7

<211> 1189

<212> DNA

<213> kanamycin resistance

<400> 7

ccgctgaggt cgcctcgtga agaaggtgtt gctgactcat accaggcctg aatcgcccca 60
 tcatccagcc agaaagttag ggagccacgg ttgatgagag ctttgttgta ggtggaccag 120
 ttggtgattt tgaacttttg ctttgccacg gaacggtctg cgttgctcggg aagatgcgtg 180
 atctgatcct tcaactcagc aaaagttcga tttattcaac aaagccacgt tgtgtctcaa 240
 aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatatatcat catgaacaat aaaactgtct 300
 gcttacataa acagtaatac aaggggtgtt atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc 360
 tcgaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc 420
 gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca 480
 gagttgtttc tgaaacatgg caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc 540
 agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt tatccgtact 600
 cctgatgatg catggttact caccactgcg atccccggga aaacagcatt ccagggtatta 660
 gaagaatatc ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgccgg 720

```

ttgcattcga ttccctgtttg taattgtcct ttttaacagcg atcgcggtatt tcgtctcgcct 780
caggcgcaat cacgaatgaa taacgggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt 840
aatggctggc ctggtgaaca agtctggaaa gaaatgcata agcttttgcc attctcaccg 900
gattcagtcg tcaactcatgg tgattttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa 960
ttaatagggtt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag accgatacca ggatcttgcc 1020
atcctatgga actgcctcgg tgagttttct ccttcattac agaaacggct ttttcaaaaa 1080
tatgggtattg ataatcctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt 1140
ttctaatacag aattgggttaa ttgggtgtaa cactggcaga gcattacgg 1189

```

<210> 8

<211> 661

<212> DNA

<213> origin of replication

<400> 8

```

ccggttgggc cgcaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 60
ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 120
actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 180
cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 240
tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg taggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 300
gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgcttatcc ggtaactatc gtcttgagtc 360
caacccggtg agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 420
agcgagggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 480
tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 540
tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa 600
gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacgcg 660
g

```

<210> 9

<211> 348

<212> DNA

<213> cytomegalovirus enhancer

<400> 9

```

ccggccgtcc catatatgga gttccgcggt acataactta cggtaaatgg ccgcctcgt 60
gaccgcccac cgaccccgcc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 120
caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtatctt acggtaaaact gccacttgg 180
cagtacatca agtgtatcat atgccaaagtc cggcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa 240
tggcccgctt ggcatatgc ccagtacatg accttacggg actttcctac ttggcagta 300
atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt tttggcgg 348

```

<210> 10

<211> 377

<212> DNA

<213> beta-actin-promoter

<400> 10

```

ccgggcccag caccccaagg cggccaacgc caaaactctc cctcctcctc ttcctcaatc 60
tcgctctcgc tctttttttt ttctcgaaaa ggaggggaga gggggtaaaa aaatgctgca 120
ctgtgcggcg aagccggtga gtgagcggcg cggggccaat cagcgtgcgc cgttccgaaa 180
gttgcccttt atggctcgag cggccggccg cggcggcgcc ctataaaacc cagcggcgcg 240
acgcgccacc accgcgaga cgcgctcgc cccgcgagca cagagcctcg cctttgccga 300
tccgcgcgcc gtccacaccc gccgccaggt aagcccggcc agccgaccgg ggcaggcggc 360
tcacggcccg gccgcag                                     377

```

<210> 11

<211> 2810

<212> DNA

<213> pCURE2 basic

<400> 11

```

gcgggcgcgtg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc 60
ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg 120
cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg ggggggtggg tggggcagga cagcaagggg 180
gaggattggg aagacaatat caggcatgct ggggatgcgg tgggctctgg gtcggccgct 240
gaggtcgcct cgtgaagaag gtgttgctga ctcataccag gcctgaatcg ccccatcatc 300
cagccagaaa gtgaggagc caggttgat gagagctttg ttgtaggtgg accagttggg 360
gattttgaac ttttgctttg ccacggaacg gtctgcgttg tcgggaagat gcgtgatctg 420
atccttcaac tcagcaaaaag ttcgatttat tcaacaaagc cacgttgtgt ctcaaaatct 480
ctgatgttac attgcacaag ataaaaatat atcatcatga acaataaaac tgtctgctta 540
cataaacagt aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt cttgctcgag 600
gccgcgatta aattccaaca tggatgctga tttatatggg tataaarggg ctcgcgataa 660
tgtcgggcaa tcaggtgcga caatctatcg attgtatggg aagcccgatg cgccagagtt 720
gtttctgaaa catggcaaaag gttagcgttg caatgatgtt acagatgaga tggtcagact 780
aaactggctg acggaattta tgcctcttcc gaccatcaag cattttatcc gtactcctga 840
tgatgcatgg ttactacca ctgcgatccc cgggaaaaca gcattccagg tattagaaga 900
atatactgat tcaggtgaaa atattgttga tgcgctggca gtgttcctgc gccggttgca 960
ttcgattcct gtttgtaatt gtccttttaa cagcgatcgc gtatttcgtc tcgctcaggc 1020
gcaatcacga atgaataacg gtttggttga tgcgagtgat tttgatgacg agcgtaatgg 1080
ctggcctggt gaacaagtct ggaaagaaat gcataagctt ttgccattct caccggattc 1140
agtcgtcact catggtgatt tctcacttga taaccttatt tttgacgagg ggaaattaat 1200
aggttgtatt gatgttgga cagtcggaat cgcagaccga taccaggatc ttgccatcct 1260
atggaactgc ctcggtgagt tttctccttc attacagaaa cggctttttc aaaaatatgg 1320
tattgataat cctgatatga ataaattgca gtttcatttg atgctcgatg agtttttcta 1380
atcagaattg gttaattggg tghtaactg gcagagcatt acggccggtt gggccgcagg 1440
aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat 1500
cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata aagataccag 1560
gcgtttcccc ctggaagctc ctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacggga 1620
tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg 1680
tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccctgt 1740
cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac 1800
gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc 1860

```

```

ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag gacagtat 1920
ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc 1980
ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttggtt gcaagcagca gattacgcgc 2040
agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cgcggccggc cgtcccatat 2100
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccg ctcgtgaccg cccaacgacc 2160
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 2220
attgacgtca atgggtggag tatttacgg aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 2280
atcatatgcc aagtccggcc cctattgac gtcaatgacg gtaaattggc cgctggcat 2340
tatgccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc 2400
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cggccgggcc cagcacccca aggcggccaa 2460
cgccaaaact ctccctctc ctcttctca atctcgctc cgctctttt ttttttcgca 2520
aaaggagggg agagggggtg aaaaaatgct gcactgtgcg gcgaagccgg tgagtgcgcg 2580
gcgcggggcc aatcagcgtg cgccgttccg aaagtgcct tttatggctc gagcggccgg 2640
ccgcggcgcc gccctataaa acccagcgcc gcgacgcgcc accaccgccg agaccgcgtc 2700
cgccccgcga gcacagagcc tcgcctttgc cgatccgccg ccgctccaca ccgcccga 2760
ggtaagcccg gccagccgac cggggcaggc ggctcacggc ccggccgcag 2810

```

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> artificial N-linker 2NF and 2NR

<400> 12

```

accatgtatg cacgtgcagc agcacgtcaa gctcgtgcgc 40

```

<210> 13

<211> 37

<212> DNA

<213> artificial C-linker 2CF and 2CR

<400> 13

```

gctacgctcg agctgctgct cgacaagcac gtgctta 37

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/06234

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K48/00 C12N15/62 C07K14/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | SCHWARZE S R S R ET AL: "In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER TRENDS JOURNAL, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 2, February 2000 (2000-02), pages 45-48, XP004189118 ISSN: 0165-6147 | 1-18, 20-64 |
| Y | the whole document --- -/-- | 1-61 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 September 2002

Date of mailing of the international search report

13/09/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wimmer, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/06234

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|---|
| Y | <p>HO A ET AL: "Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo"</p> <p>CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 61, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 474-477, XP002179150</p> <p>ISSN: 0008-5472</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> | 19 |
| X | <p>PHELAN A ET AL: "INTERCELLULAR DELIVERY OF FUNCTIONAL P53 BY THE HERPESVIRUS PROTEINVP22"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUB. CO, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 440-443, XP000979081</p> <p>ISSN: 1087-0156</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> | 1-3, 12-16, 21,23, 25,37, 43,44, 47-49, 56-61 |
| Y | <p>the whole document</p> <p>---</p> | 1-61 |
| X | <p>KWON H Y ET AL: "Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells"</p> <p>FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 485, no. 2-3, 24 November 2000 (2000-11-24), pages 163-167, XP004337789</p> <p>ISSN: 0014-5793</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> | 1-4,10, 12-18, 20,21, 43,44, 47-49, 56-60 |
| E | <p>WO 02 055684 A (UNIV IOWA RES FOUND ;MAO QINWEN (US); XIA HAIBIN (US); DAVIDSON BE) 18 July 2002 (2002-07-18)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p> | 1-18, 20-64 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 02/06234

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although Claims 58-61 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the claimed vectors.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/06234

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 02055684 A | 18-07-2002 | WO 02055684 A2 | 18-07-2002 |

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K48/00 C12N15/62 C07K14/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K A61K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | SCHWARZE S R S R ET AL: "In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER TRENDS JOURNAL, CAMBRIDGE, GB, Bd. 21, Nr. 2, Februar 2000 (2000-02), Seiten 45-48, XP004189118 ISSN: 0165-6147 | 1-18, 20-64 |
| Y | das ganze Dokument --- -/-- | 1-61 |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. September 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

13/09/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wimmer, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|---|
| Y | <p>HO A ET AL: "Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo"</p> <p>CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 61, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 474-477, XP002179150 ISSN: 0008-5472 das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 19 |
| X | <p>PHELAN A ET AL: "INTERCELLULAR DELIVERY OF FUNCTIONAL P53 BY THE HERPESVIRUS PROTEINVP22"</p> <p>NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUB. CO, NEW YORK, NY, US, Bd. 16, Nr. 5, Mai 1998 (1998-05), Seiten 440-443, XP000979081 ISSN: 1087-0156 das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-3, 12-16, 21,23, 25,37, 43,44, 47-49, 56-61 |
| Y | <p>das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-61 |
| X | <p>KWON H Y ET AL: "Transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase mediated by an HIV-1 Tat protein basic domain into mammalian cells"</p> <p>FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 485, Nr. 2-3, 24. November 2000 (2000-11-24), Seiten 163-167, XP004337789 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-4,10, 12-18, 20,21, 43,44, 47-49, 56-60 |
| E | <p>WO 02 055684 A (UNIV IOWA RES FOUND ;MAO QINWEN (US); XIA HAIBIN (US); DAVIDSON BE) 18. Juli 2002 (2002-07-18) das ganze Dokument</p> <p>-----</p> | 1-18, 20-64 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/06234

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl die Ansprüche 58-61 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der erfindungsgemässen Vektoren.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 02/06234

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument

Datum der
Veröffentlichung

Mitglied(er) der Patentfamilie

Datum der
Veröffentlichung

WO 02055684

A

18-07-2002

WO

02055684 A2

18-07-2002